

201034004B

厚生労働科学研究費補助金
医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

献血の安全性確保と安定供給のための新興
感染症等に対する検査・スクリーニング法等
の開発と献血制限に関する研究

(H20-医薬-一般-077)

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

平成23 (2011) 年3月

研究代表者 倉根 一郎

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

献血の安全性確保と安定供給のための新興
感染症等に対する検査・スクリーニング法等
の開発と献血制限に関する研究

(H20-医薬-一般-077)

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

平成23 (2011) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総合研究報告

献血血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する検査・スクリーニング法等の開発
と献血制限に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）

II. 分担研究総合報告

血液からの異常プリオン除去法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

研究分担者：岡田義昭（国立感染症研究所・血液安全性研究部）

国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究（慢性期シャーガス病の調
査研究・・ 17

研究分担者：三浦左千夫（慶應義塾大学・医学部）

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び国内献血におけるシャーガス病の感
染リスクの把握・・ 21

研究分担者：百瀬俊也（日本赤十字社・血液事業本部）

献血制限に関する昆虫媒介性感染症の問題・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

研究分担者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45

研究分担者：田島茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

I. 総合研究報告書

総合研究報告書

献血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する検査・スクリーニング法等
の開発と献血制限に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）

研究要旨：

献血の安全性確保と安定供給のため、変異型プリオン病、シャーガス病、およびウエストナイルウイルス等のフラビウイルスを対象として検査・スクリーニング法等の開発と献血制限に関する研究を行った。異常プリオン除去法の開発については、キレート剤の添加によって異常プリオンの *in vitro* での定量性が安定化した。また、界面活性剤を用いて異常プリオンを処理する場合、使用した界面活性剤の種類によって異常プリオンの大きさが変化し 20nm のウイルス除去膜による除去効率に大きな影響を与えることが明らかとなった。マウス白血病ウイルスの感染は異常プリオンの感染性を増幅することが明らかとなった。シャーガス病キャリアーの把握については、在日日系ブラジル人の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて 3 名の抗体陽性者を見出した。一方、シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する献血申込者数及び献血者数を集計、解析した。ブラジル居住歴を有する者はいずれも全体の約半数を占めた。ウエストナイルウイルススクリーニング試薬として備蓄している TMA 法の WNV-NAT 試薬、TaqMan PCR 法の試薬いずれも期待される結果が得られた。日本脳炎ウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカの飛翔範囲は、100～150m でありウイルスを持った蚊自体が広範に分散することはない。一方、ウエストナイルウイルス媒介蚊アカイエカの最大飛翔距離が 1,217m であること示された。高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。さらに本クローンのマイナス鎖 RNA を導入した細胞よりルシフェラーゼ活性を検出した。

研究分担者：

岡田 義昭（国立感染症研究所血液安全性
研究部 室長）

小林 睦生（国立感染症研究所昆虫医科学
部 部長）

田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一
部 主任研究官）

三浦左千夫（慶応大学医学部熱帯医学寄生
虫学教室 助教）

百瀬 俊也（日本赤十字社血液事業本部
課長）

A. 研究目的

近年、ヒトや物の国際間の頻繁な移動によって感染症が拡大し、これまで日本には存在しなかった病原体が国内に持ち込まれるリスクがある。特に国内でウエストナイル熱やデング熱等が発生した場合、スクリーニング法の導入の他に早期に適切な献血制限地域を設定し、一方で必要な献血量を確保しなければならない。これらの感染症は蚊が媒介するため、蚊の種類や行動範囲、蚊の体内でのウイルスの越冬の有無などを基に制限地域を設定する必要がある。本研究ではスクリーニング法の開発や献血制限を科学的知見から検討することによって安全な血液の供給を目指す。シャーガス病は南米に流行する慢性の感染症である。これまで南米居住歴を有する献血者の抗体保有率等の研究は実施されていなかったが、実態を明らかにすることで南米居住歴を有する献血者からの献血制限等を検討し、輸血の安全性に貢献する。また、変異型プリオン病に関しては、効果的な血液からのプリオン除去法を開発する。本研究によって献

血の安全性確保と安定供給に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

1. 異常プリオン除去法の開発：

異常プリオンの除去法を開発することによって、血液製剤の安全性の向上と献血制限の緩和を目指す。結果が得られるまで長期間を要する動物実験の代用として *in vitro* 感染系を確立し、さらに、この系を用いて生体膜に存在するプリオンのリガンドの検索を継続し、生体分子を用いた異常プリオン除去法を開発する。

2. シャーガス病キャリアーの把握

欧米においては、シャーガス病侵淫地である南米からの移民からの輸血や臓器移植によるシャーガス病の感染が問題になっている。我が国においても南米出身者からの献血を介した感染リスクが存在する。在留ラテンアメリカ人の在住登録者の多い地域において輸血による感染リスクを評価する。

3. アルボウイルスに関する研究

ウエストナイルウイルス等のアルボウイルスが国内に侵入するリスクがある。媒介する蚊が日本に存在するため、診断がつかないまま感染が拡大し、輸血を介して感染する危険性と献血制限による輸血用血液の不足が危惧される。国内発生に備えて、診断法やスクリーニング法の開発、及びその具体的実施体制を検討する。さらに、適切な献血制限を実施するために、蚊の行動範囲や分布密度を解析する。

（倫理面への配慮）

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。動物を用いる実験の倫理面においては、各研究機関の動物実験委員会において審査し承認を得た上で行なった。

C. 研究結果

1. 血液からの異常プリオン除去法の開発：

血漿分画製剤からの異常プリオン除去法の開発を目的に異常プリオンの性状を解析し、以下の成果を得た。BSE 牛由来の異常プリオンが感染した細胞は、培養上清中に異常プリオンを産生する。室温に静置すると感染価の定量性がなくなるため除去効率の評価が困難であった。この問題を解決するためにキレート剤を添加することにより除去効率の評価が可能になった。キレート剤存在下に 20nm のウイルス除去膜を用いて異常プリオンの除去を検討したところ、効果的な異常プリオンの除去が可能であった。ウイルス除去膜 (20nm) による異常プリオン除去について界面活性剤の影響を検討し、界面活性剤の種類によっては異常プリオンの除去能に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。マウス白血病ウイルスを感染させた細胞株では異常プリオンが感染し易くなり、異常プリオンの量が増加した。

2. 国内外でのシャーガス病キャリアーの把握：

在日日系ブラジル人の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて3名の

抗体陽性者を見出した。迅速キットの開発については既存の検査キットと結果は一致し、なおかつ献血現場で充分判定が可能なキットの試作が出来た。また、献血希望者に対する安全血液提供を呼びかける啓発用パンフレットを作成した。

3. ウエストナイル熱及びシャーガス病を対象とした献血におけるリスクの把握：

ウエストナイルウイルス (WNV) の国内感染が認められた場合の献血者への対応については、感染媒体ごとに献血制限範囲や WNV-NAT の実施有無などが示されている。都道府県単位で1ヵ月間 WNV-NAT が実施できるよう当該試薬を日本赤十字社に備蓄しており、献血者が最も多い東京都の1ヵ月平均 51,000 人で1.8ヵ月間検査可能であると試算された。さらに迅速かつ広域的な対応を可能とするために、日本赤十字社4ヵ所の NAT 施設へ導入している市販検査システムを用いて、同社が開発した WNV-NAT 試薬の感度、特異性等について検討した。95% 検出感度は 30copies /mL であった。特異性・交差反応試験 (RNA 抽出産物) は、WNV NY99 株は 0.01 pfu /mL (91copies/mL) までは陽性率 100% で、0.001 pfu /mL (9.1copies/mL) では陽性率が 50% であった。日本脳炎ウイルスでは交差反応性が認められたが、デングウイルスはすべて陰性であった。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する献血申込 (受付) 者数及び献血者数を集計・解析した。その数は年々増加しており、2010 年では献血申込 (受付) 者数 11,594 人、献血者数 9,805 人であり、献血申込 (受付) 者の約 85% が献

血していた。その内ブラジル居住歴を有する者が最も多く、全体の 42%を占めた。中南米居住歴のある者の都道府県別の献血者数では、東京都、神奈川県、愛知県が 1,000 人を超えており、その内ブラジル居住歴のある者の都道府県別の献血者数では、愛知県（2010 年 759 人）が最も多く、以下、東京都、神奈川県、静岡県の順が多かった。年代別では 30 代が最も多かった。全体では 30 代以下が約 6 割、40 代以上が約 4 割であった。中南米地域からの定住者が多い東海四県（愛知県、静岡県、岐阜県、三重県）内における献血申込（受付）者のうち同意を得た者に対し、*Trypanosoma cruzi* 抗体検査を実施した。陽性者は認められていない。

4. アルボウイルス媒介蚊の分布、飛翔範囲：

ウエストナイルウイルスの潜在的な媒介蚊と考えられているアカイエカの移動範囲に関してはほとんど情報がない。都市域で行ったアカイエカの標識再捕獲実験の結果から一日の平均移動距離ならびに調査期間中の移動範囲を推定した。アカイエカに関して、4 日間のトラップ採集によって、56 雌が再捕獲された。成虫の平均移動距離を求めた結果、平均移動距離は 1 日目 470m、2 日目 287m、3 日目 326m、4 日目 517m と推定された。放逐場所からの距離の対数値と平均捕獲個体数+1 の対数値を用いて、回帰分析を行ったところ有意な回帰直線が得られた。回帰直線に基づいて最大飛翔距離を推定したところ、1,217mであった

チクングニアウイルスは、蚊体内での増殖速度が著しく早く、感染後 2 日目には唾

液腺にウイルスが確認されている。チクングニアウイルスの媒介蚊は、我が国では青森県以外の東北以南の地域に広く分布するヒトスジシマカである。生息密度が高い場所では、8 分間吸血飛来してきた雌成虫を捕虫網で捕集すると 20-50 頭捕集される環境が存在する。その意味で、チクングニヤ熱患者の居住環境によっては、容易にウイルスを取り込み、近隣の住人に感染を起こす可能性が予想される。

5. フラビウイルス新規検出法開発：

迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムプラスミドおよびミニゲノム RNA の複製を評価するために必要なデングウイルスレポーターレプリコンプラスミドの構築を試みた。両クローンの構築に成功した。デングウイルスレポーターレプリコンを使用しミニゲノム RNA の複製能の評価を試みたが、レプリコンが複製せず評価が出来なかった。一方、レポーターミニゲノムのマイナス鎖からルシフェラーゼ活性を検出することに成功したことから、ミニゲノムが感染性ウイルスのインジケーターとなりうることが示された。日本脳炎ウイルスでも同様のレポーターレプリコンを作製した。日本脳炎ウイルスレプリコン RNA を細胞に導入したところ複製が確認された。

D. 考察

血漿分画製剤の病原体除去法として広く使用されているウイルス除去膜による異常プリオン除去について界面活性剤の影響を検討した。界面活性剤の種類によっ

て異常プリオンの大きさが異なることが示唆された。感染細胞から産生される異常プリオンの除去には 20nm のウイルス除去膜が有効であることが示されたが、製造工程で使用される界面活性剤の種類によっては異常プリオンの除去能に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。

シャーガス病キャリアーの把握においては、各地医療機関からはラテンアメリカ人の心疾患（心拡張症）の場合にシャーガス病除外診断が求められた。医療現場でシャーガス病について関心が示され始め二次感染予防にも繋がる。210名の検査希望者についての *T. cruzi* 抗体検査をすることが出来たが、在日外国人対象の活動ではコミュニティーネットワークが重要である。迅速抗体スクリーニングキットは、既存のものと同レベルの感度であり、抗体スクリーニングには充分評価できるものと考えられた。シャーガス病に関しては、2008年に中南米居住歴を有する献血者が年間7,700人いることが明らかとなった。約半数がブラジル居住歴を有する献血者であった。その献血者の年齢分布では、感染リスクの低いと考えられる30代以下の若い世代が約2/3を占めていた。愛知県、静岡県など東海地域にブラジル居住歴を有する献血申込者が偏在していることから、これらの地域で、中南米居住歴を有する献血申込者に対して、*T. cruzi* 抗体検査など具体的な検討を行う必要があると考えられた。

WNV-NAT の実施体制の準備を進めるうえで、発生時に迅速に対応するためには、4カ所の NAT センターいづれでも実施可能な TaqMan PCR 法の試薬の検討も必要であると考ええる。

アカイエカの最大飛行距離は 1,217m と推定された。平均移動距離が 287m~517m と推定されているので、放逐されたアカイエカは平均して数百メートルの範囲を毎晩探索しながら、結果として 1.2km ほどの範囲に拡散していったと考えられる。アカイエカと近縁のネッタイエカの飛行距離に関する報告と比較すると、ネッタイエカの最大飛行距離は 200 から 1,270m であり、両種の飛行能力にはさほど大きな違いがないと考えられる。今回得られたのは吸血動物を探索飛行している雌個体の移動範囲であり、吸血に成功した個体や産卵のために幼虫の発生水域を探索している個体の飛行パターンはこれとはまったく異なると考えられる。これらの生理的な状態が異なるアカイエカの移動範囲に関しても、今後の調査研究が必要である。

一方、ヒトスジシマカは 100~150m が行動範囲と言われているが、患者の行動範囲も考慮しつつ、患者宅周辺の狭い範囲に二次、三次の患者が発生する可能性を排除するために、成虫防除対策と適正な献血制限地域の設定を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

異常プリオン除去法の開発については、キレート剤の添加によって異常プリオンの *in vitro* での定量性が安定化した。また、界面活性剤を用いて異常プリオンを処理する場合、使用した界面活性剤の種類によって異常プリオンの大きさが変化し 20nm のウイルス除去膜による除去効率に大きな影響を与えることが明らかとなった。また、マウス白血病ウイルスの感染は異常プリオン

の感染性を増幅することが明らかとなった。

シャーガス病キャリアーの把握については、在日日系ブラジル人の検査希望者について *T. cruzi* 抗体検査を行った。在日外国人の本疾患感染状況の把握するためラテンアメリカ人集住地域での健康相談会にて 3 名の抗体陽性者を見出した。一方、シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。ブラジル居住歴を有する者はいずれも全体の約半数を占めた。

ウエストナイルウイルススクリーニング試薬として備蓄している TMA 法の WNV-NAT 試薬だけでなく、TaqMan PCR 法の試薬も期待される結果が得られた。日本脳炎ウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカの飛翔範囲は、100～150m であり、ウイルスを持った蚊自体が広範に分散することはない。一方ウエストナイルウイルス媒介蚊アカイエカの最大飛翔距離が 1,217m であること示された。

迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。さらに本クローンのマイナス鎖 RNA を導入した細胞よりルシフェラーゼ活性を検出した。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda Y, O. Komagata, S. Kasai, T. Hayashi, N. Nihei, K. Saito, M. Mizutani, M. Kunida, M. Yoshida and M. Kobayashi.

A.: mark-release-recapture study on dispersal and flight distance of *Culex pipiens pallens* in an urban area of Japan. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24: 339-343, 2008.

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M.: Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology.* 15;391(1):119-29, 2009

Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.

竹内勤、三浦左千夫：しのびよるシャーガス病— 中南米の知られざる感染症。慶應義塾大学出版 2009年

2. 学会等発表

1) 国際学会

なし

2) 国内学会

岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE 由来プリオンの in vitro 感染系の確立とその応用（第 2 報）、プリオンシンポジウム 2008、新得（北海道）、2008 年

岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE 由来プリオンの in vitro 感染系の確立とその応用、第 56 回日本ウイル

ス学会、岡山、2008年

梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、
嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液
製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス
不活化法の開発、第56回日本ウイルス学会、
岡山、2008年

岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プリ
オンの *in vitro* 感染系の確立とその応用
(第3報)、プリオンシンポジウム2009、
蔵王(宮城)、2009年

岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子：
プリオン感染細胞から培養液中に産生され
る異常プリオンの性状、第57回日本ウイル
ス学会、東京、2009年

三浦 左千夫、竹内 勤：輸入感染症：在
日ラテンアメリカ人の慢性シャーガス病キ
ャリアーと2次感染予防 58回日本臨床
寄生虫学会東
日本学術集会

津田良夫、駒形修、葛西真治、林利彦、二
瓶直子、斉藤一三、水谷正時、国田正忠、
吉田政弘、小林睦生。都市環境におけるアカ
イエカの飛翔距離。第60回日本衛生動物
学会大会(下野市)、2008年4月17-19日。

加藤文博、田島茂、司馬肇、細野邦昭、高
崎智彦、倉根一郎：フラビウイルスレポー
ターレプリコンの構築 第58回日本ウイル
ス学会学術集会 徳島 2010年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

血液からの異常プリオン除去法の開発

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

血漿分画製剤からの異常プリオン除去法の開発を目的に異常プリオンの性状を解析し、以下の成果を得た。

1. BSE 牛由来の異常プリオンが感染した細胞は、培養上清中に異常プリオンを産生する。
2. 室温に静置すると感染価の定量性がなくなるため除去効率の評価が困難であった。
3. 2 を解決するためにキレート剤を添加することにより除去効率の評価が可能になった。
4. キレート剤存在下に 20nm のウイルス除去膜を用いて異常プリオンの除去を検討したところ、効果的な異常プリオンの除去が可能であった。
5. ウイルス除去膜（20nm）による異常プリオン除去について界面活性剤の影響を検討し、界面活性剤の種類によっては異常プリオンの除去能に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。
6. マウス白血病ウイルスを感染させた細胞株では異常プリオンが感染し易くなり、異常プリオンの量が増加した。

A. 研究目的

1995 年に初めてヒトで報告された変異型 CJD (vCJD) は 2000 年に発症例のピークを迎えたが、以後ウシの対策と相まって発症例は急激に減少し、現在では年に数例の発症例が認められるだけとなった。しかし、過去の kuru では感染してから発症まで 50 年以上を要した例もあることから、今後も

長期にわたり発症例が続くことが懸念されている。輸血を介した vCJD 感染例が英国においてこれまでに 4 例報告されている。血漿分画製剤による感染も危惧されていたが、英国の血友病患者の脾臓から異常プリオンが検出され、理論的なリスクが現実のものとなった。輸血用も含めた血液製剤の異常プリオンに対する対策として、プリオン除

去法の開発は非常に重要である。しかし、血液中に存在する異常プリオンは非常に微量なため、どのような様式で血液中に存在しているのか解析されていない。また、動物由来の *in vitro* で増殖可能な異常プリオン株は存在するが、培養上清で感染が伝達できる異常プリオン株の報告はない。これまでの異常プリオンの除去は、動物脳由来の異常プリオンを乳剤、あるいは精製した状態で血液または、血漿分画製剤の製造工程に添加することによって評価されていた。異常プリオン除去の効率は、評価に用いた異常プリオンの由来によって大きく変わることが知られ、現在のまでのところ標準的な除去の評価法は定まっていない。我々は、*in vitro* でウシ海綿状脳症 (BSE) 由来の異常プリオンが培養できることを明らかにし、しかも培養上清中にも感染性異常プリオンを産生することを明らかにした。この培養系を用いて、血漿分画製剤メーカーが導入しているウイルス除去膜による異常プリオン除去効果の検討や培養液中での異常プリオンの存在様式について3年間研究を実施した。

B. 研究方法

(1) 異常プリオンの検出法

細胞を 0.4 mL の Lysis buffer (150 mM NaCl、0.5% Triton X-100、0.5% sodium deoxycholate、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) に溶解後、1 万 g 1 分間の遠心によって核成分を除いた上清を得た。タンパクを定量

し、200 μ g/200 μ L に調整後、Proteinase K (PK) を最終濃度 20 μ g/mL になるように添加し、37°C で 45 分間反応させた。10 μ L の pefablock を加えて PK の反応を止め、9 倍量のメタノールを添加し、20°C にて 3400 g、30 分の遠心を行った。沈殿は尿素入りのローディングバッファーに溶解し、ウエスタンブロット (以下 WB) を行った。異常プリオンの検出はウサギ抗ヒトプリオン抗体を用いた化学発光法によって行った。

(2) 異常プリオンを含む培養上清の調整

WB にて感染が確認された感染細胞株を牛の脳乳剤の混入を否定するために 6 ヶ月以上継代した。感染細胞株の培養上清を 10000 g、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去し、さらに 0.45 μ m のフィルターで濾過した。0.5 mL に分注して -80°C で保存した。

(3) *In vitro* 感染価測定法

感染前日に 24 穴プレートに 1×10^5 個の細胞を播く。培養上清を種々の濃度に PBS を用いて 10 倍ずつの段階希釈し、非感染細胞に各 100 μ L ずつ添加した。細胞と異常プリオンとの接触を亢進させるためにポリブレンを最終濃度 5 μ g/mL になるように添加した。感染 2 時間後に 1 mL の新しい培養液を加え培養した。コンフルレント状態になった後に 6 穴プレートに移し、2 回/週の頻度で継代した。感染の有無は、

感染 3-4 週後に (1) の方法によって検出した。異常プリオンのバンドが検出できた最大希釈倍率を感染価とした。なお、継代によるコンタミネーションを防止するために、全てのチップは綿栓付きのものを使用した。

(4) キレート剤処理による感染価測定に与える影響

プリオンタンパクは凝集し易いことが知られており、異常プリオンを含む培養上清の処理操作中に凝集しないようにすることは、除去効率を正確に評価するためや安定した成績を得るために必要である。そこで安価で細胞に影響が少ないキレート剤を培養液に添加し、感染性を評価した。異常プリオンを含む培養上清を 2 つに分け、一方にキレート剤を、他方にコントロールとして PBS を添加し、60 分間室温に静置した。静置した各々の培養液を (3) の方法に従って希釈後、細胞に感染させ感染価を求めた。なお、添加したキレート剤の濃度では細胞増殖に大きな影響はなかった。

(5) ウイルス除去膜におけるキレート剤及び界面活性剤処理による異常プリオン除去

キレート剤が添加された培養液を 20nm のポアサイズのウイルス除去膜によって濾過した。濾液は (3) の感染価測定法に従って希釈後、細胞に感染させ、4 週間継

代し、感染価を測定した。

Triton X-100 を用いた処理では、(2) で調整した培養液に最終濃度 1% となるように Triton X-100 を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、処理した培養上清を 2 つに分け、一方は 20nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過し、他方はコントロールとした。ウイルス除去膜は、前処置として異常プリオンを含まない培養液で置換し、非特異的に異常プリオンが吸着しないようにした。濾過前後の培養液は

(3) の感染価測定法に従って 10 倍ずつの段階希釈後、細胞に感染させ、4 週間継代し感染価を測定した。

SDS 処理では、2 で調整した培養液に最終濃度 2% となるように SDS を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、培養上清を 2 つに分け、一方の培養液は 20nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過し、他方はコントロールとした。ウイルス除去膜は、前処置として異常プリオンを含まない培養液で置換し、非特異的に異常プリオンが吸着しないようにした。濾過前後の培養液は (3) の感染価測定法に従って 10 倍ずつの段階希釈後、細胞に感染させ、4 週間継代し感染価を測定した。

また、添加した界面活性剤による細胞への影響と予備的に感染価を検討し、処理した培養液は 10^{-5} 以上に希釈し高感受性細胞に感染させた。

(6) 異常プリオン感染に及ぼすマウス白

血病ウイルスの影響

培養液中の異常プリオンの性状を解析するために、脳神経由来細胞株と腎由来細胞株、及び肺由来細胞株にマウス白血病ウイルスを感染させた。3ヶ月以上継代し、全ての細胞がウイルスに持続感染している状態にした。これらの感染細胞とコントロールとして非感染細胞を 1×10^5 ずつ 24 穴プレートにまき、それぞれに異常プリオンを含む脳乳剤を同量ずつ添加して感染させた。ウシ胎児血清を最終濃度 3% になるように培養液に加え 2 日毎に培養液を交換した。細胞の継代は 2~3 週間に 1 回の頻度で行ない、常時コンフルレントな状態で維持するように培養を行ない、継代時の細胞を 10cm のディッシュで増殖させウエスタン用のサンプルとした。異常プリオンの検出は、1 に従った。また、細胞から産生される vesicle に関連した EF-1 α や flotillin、tsg101 抗原の発現についても解析した。

C. 研究結果

(1) キレート剤による感染価の評価

凍結されている培養液を溶解後、室温に 1 時間静置すると感染性が認められなくなった。一方、キレート剤を添加した培養液からは 10^9 希釈まで異常プリオンのバンドが検出されるようになった。

(2) ウイルス除去膜による異常プリオンの除去効果

キレート剤を添加した培養液を 20nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ、濾過前の検体から検出された異常プリオンのバンドはどの希釈検体からも検出されなかった。

感染細胞から産生される異常プリオンを Triton X-100 又は SDS 処理し、感染価を測定したところ、感染性は保持され、両者の間では感染価に著名な差は認められなかった。各の界面活性剤処理したプリオン液を 20nm のポアサイズを有するウイルス除去膜を用いて濾過したところ、Triton X-100 処理した濾液を感染させた細胞から異常プリオンは検出されず、効率良く異常プリオンが除去されたことが明らかとなった。一方、SDS 処理した異常プリオンは濾液を感染させた細胞からも異常プリオンが検出され、感染価はウイルス除去膜で濾過する前のものと変わらなかった。SDS 処理によって 20nm のウイルス除去膜では異常プリオンはトラップできないことが明らかとなった。

(3) 異常プリオン感染に及ぼすマウス白血病ウイルスの影響

異常プリオンを感染させ、継代したところ、マウス白血病ウイルスの感染の有無による各細胞株への形態的な差は生じなかった。感染 12 週後の細胞から異常プリオンを WB 法で検出したところ、マウス白血病を感染させた細胞は非感染細胞に比べて異常プリオンのシグナルが増加してい

た。特に、腎癌細胞株においては、マウス白血病ウイルス非感染細胞では異常プリオンのシグナルは確認できなかったが、マウス白血病ウイルス感染細胞では強い異常プリオンのシグナルが確認できた。一方、マウス白血病ウイルス感染によって EF-1 α や flotillin、tsg101 抗原等の発現に明らかな変化は認められなかった。

D. 考察

血漿分画製剤は多くの供血者の血漿を 3000L 前後にプールして製造され、多種類の製剤と多数の製剤が同一の血漿から作られる。品質的に均一な製剤を供給できるメリットもあるが、一方で、原料血漿に異常プリオンが混入した場合、多くの患者が暴露される危険性もある。ウイルス感染防止のために各血漿分画製剤メーカーは、2 工程以上のウイルス除去・不活化が期待できる工程を導入している。これらの工程中には異常プリオンも除去可能なことが報告されている。我々は、本研究班の研究により、感染細胞から産生される異常プリオンがウイルス除去膜によって除去されることを成果として報告した。さらに、2 種類の界面活性剤でそれぞれ処理した異常プリオンをウイルス除去膜で濾過し、異常プリオン除去効率に与える影響を検討した。TritonX-100 処理では除去膜によって無処理と同等に効率良く除去されたのに対し、SDS 処理では素通りし、除去できなかった。これは TritonX-100 処理では非

特異的に膜に異常プリオンが吸着した可能性も否定できないが、無処理の異常プリオンも除去できることから、感染細胞から産生される異常プリオンは 20nm よりも大きく、Triton X-100 処理しても大きさの影響を受けなかったためと理解できる。一方、SDS 処理では異常プリオンの大きさが 20nm 以下になったためにウイルス除去膜を通過したと推定できる。このように界面活性剤の種類によってウイルス除去膜による除去効率が著明に変化することが明らかとなった。製造工程に界面活性剤を用いる場合、界面活性剤の種類によって異常プリオンの性状が著しく変わる可能性を考慮する必要がある。なお、我々が評価した異常プリオンは SDS 処理しても処理していない検体と同等の感染価を示した。対象として、ウイルスとしては安定なヒトパルボウイルス B19 を同様に SDS 処理したところ、1 時間処理で完全に感染力は消失した。

また、異常プリオンが結合する生体分子の解析では、レトロウイルス感染によって「出芽」に関連する遺伝子の発現が亢進することが知られており、これらの中に異常プリオンと結合する分子が存在する可能性がある。これを解析するために、異常プリオンをマウス白血病ウイルス細胞株に感染させ、感染効率を検討した。ウイルスの感染によって明らかに異常プリオンの感染効率が上昇したが、vesicle に関連する生体分子の量に著明な差は認められ

なかった。特に腎癌細胞株では、マウス白血病ウイルスを前もって感染させておくと感染効率は著明に亢進した。マウス白血病ウイルスは、既にマウス白血病ウイルスに感染した細胞には感染できないので、ウイルスに異常プリオンが取り込まれて感染が拡大する可能性はない。従って、ウイルス感染が宿主細胞内でのプリオン産生を促進させるのか、または、ウイルスが細胞外に放出される機構を利用して、異常プリオンが細胞外に非感染よりも効率的に放出される可能性がある。

E. 結論

キレート剤の添加によって異常プリオンの *in vitro* での定量性が安定化した。また、界面活性剤を用いて異常プリオンを処理する場合、使用した界面活性剤の種類によって異常プリオンの大きさが変化し 20nm のウイルス除去膜による除去効率に大きな影響を与えることを明らかにした。

また、マウス白血病ウイルスの感染は異常プリオンの感染性を増幅することが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) N. Shimazaki, T. Kiyohara, A. Totsuka, K. Nozima, Y. Okada et al.: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic

pressure: variation among laboratory strains.

Vox Sanguinis 96.14-19.2009

2) Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., Okada Y., and Yamaguchi K.: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a”, determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit.

Clinica chimica Acta, 2010, vol. 411: 605-606

3) 種市 麻衣子、岡田 義昭、上村 晃一郎、他：血液凝固第9因子国内標準品の力価測定、日本輸血細胞治療学会誌、第54巻、第1号、43-47、2008年

2. 学会発表

1) 岡田義昭：血小板製剤の病原体不活化、第15回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、大阪、2008年

2) 岡田義昭：血液製剤の現状と今後の課題、第22回エイズ学会ランチョンセミナー、大阪、2008年

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用（第2報）、プリオンシンポジウム2008、新得（北海道）、2008年

4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年

5) 梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第56回日本ウイルス学会、

岡山、2008年

6) 岡田義昭：パルボウイルス感染の解析、
第79回日本感染症学会西日本地方会学術集
会、福岡、2009年

7) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プ
リオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用
(第3報)、プリオンシンポジウム2009、蔵
王(宮城)、2009年

8) 岡田 義昭、水沢 左衛子、
梅森 清子：プリオン感染細胞から培養液
中に産生される異常プリオンの性状、
第57回日本ウイルス学会、東京、2009年

9) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、浜
口 功：新規レトロウイルス XMRV の検出法と
性状解析、第58回日本ウイルス学会、徳島、
2010年

10) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡
田 義昭：血液製剤におけるC型肝炎ウイルス
の不活化の検討、第58回日本ウイルス学会、
徳島、2010年

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

国内外でのシャーガス病キャリアーの把握と献血対策に関する研究
(慢性期シャーガス病の調査研究)

研究分担者:三浦左千夫 慶應義塾大学医学部・助教
研究協力者:関 健介 杏林大学保健学部・助教

研究要旨:在日ラテンアメリカ人の定住化が進み、地域に密着した活動として献血に協力するものも少なくない。しかし彼らには南米特有のシャーガス病の慢性感染者が潜んでいる可能性が極めて高いことが各地で行った抗体検査で明らかになってきた。本疾患を媒介する昆虫が生息しない我が国では輸血感染、臓器移植感染、母子感染以外に感染経路は皆無である。輸血、細胞臓器移植治療による、感染防止対策上、医療現場で対応できる *T. cruzi* 抗体についてのスクリーニングを行うことの出来る迅速診断キットの検討を行う。在日外国人の本疾患感染状況の把握とその健康管理のためのガイドライン作成に必要な情報を提供する。

A. 研究目的

- ①在日ラテンアメリカ人の *Trypanosoma cruzi*(*T. cruzi*)抗体保有者の検索。
- ②献血現場で対応できる迅速抗体測定キットの開発検討。
- ③既存の研究検査用キットの診断用キットとしての評価検討

B. 研究方法

- 1)疫学調査:在日ラテンアメリカ人集住地域において NPO、ブラジル領事館などの協力の基で調査研究参画への同意書が得られた人たちを対象に抗体検査を行った。
- 2)ラテンアメリカ人集住地域医療機関からの検査以来を受けた血清を用いて病原体 *T. cruzi* に対する IgG 抗体の有無をクロマト法、IHA, IFA、Dot-ELISA 法で調

べた。

- 3)既存の抗体検出キット(試験研究用)を用いて、それぞれの利便性、信頼性について検討すると同時に、安価で信頼性のあるスクリーニング用検査キットの開発を既存キットと比較検討した。

C. 研究結果

1&2)群馬県、茨城県、長野県、静岡県、山梨県、愛知県、滋賀県下のラテンアメリカ人定住者コミュニティーのある地域にて *T. cruzi* 抗体の有無について Chagas-Stat-Pack(Chembio)および、Instant-ChagasCheck(EY-Labo 開発途上キット)を用いて検討した。

2008年から2010年12月末までの検査総数は1048名であった、年度末3月中には1100余名の調査が行われるで